

Rev.MVZ Córdoba 21(3):5569-5576, 2016. ISSN: 0122-0268

SHORT COMMUNICATION

First phylogenetic analysis of *Ehrlichia canis* in dogs and ticks from Mexico. Preliminary study

Primer análisis filogenético de *Ehrlichia canis* en perros y garrapatas de México. Estudio preliminar

Carolina G. Sosa-Gutiérrez,^{1*} Ph.D, Teresa Quintero-Martínez,² Ph.D,
Margarita Vargas-Sandoval,³ Ph.D, Guadalupe Gordillo-Pérez,⁴ Ph.D.

¹Laboratorio Nacional de Genómica y Salud. Texcaltitla, Km 67.5. Singuilucan, Hidalgo. México. ²Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ciudad Universitaria, S/N. México D.F, México. ³Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Agrobiología, Departamento de Entomología. Av. Lázaro Cárdenas S/N, Col. Revolución, C.P. 60150, Uruapan, Michoacán. México. ⁴Instituto Mexicano del Seguro Social. Centro Médico Nacional Siglo XXI. Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Cuauhtémoc, Nro. 330, Col. Doctores. México D.F, México. *Correspondence: mcarososagt@yahoo.com.mx

Received: March 2015; Accepted: February 2016.

ABSTRACT

Objective. Phylogenetic characterization of *Ehrlichia canis* in dogs naturally infected and ticks, diagnosed by PCR and sequencing of *16SrRNA* gene; compare different isolates found in American countries. **Materials and methods.** Were collected Blood samples from 139 dogs with suggestive clinical manifestations of this disease and they were infested with ticks; part of *16SrRNA* gene was sequenced and aligned, with 17 sequences reported in American countries. Two phylogenetic trees were constructed using the Maximum likelihood method, and Maximum parsimony. **Results.** They were positive to *E. canis* 25/139 (18.0%) dogs and 29/139 (20.9%) ticks. The clinical manifestations presented were fever, fatigue, depression and vomiting. *Rhipicephalus sanguineus* *Dermacentor variabilis* and *Haemaphysalis leporis-palustris* ticks were positive for *E. canis*. Phylogenetic analysis showed that the sequences of dogs and ticks in Mexico form a third group diverging of sequences from South America and USA. **Conclusions.** This is the first phylogenetic analysis of *E. canis* in Mexico. There are differences in the sequences of Mexico with those reported in South America and USA. This research lays the foundation for further study of genetic variability.

Keywords: Ehrlichiosis, sequencing, *16SrRNA*, genetics, etiology (Source: MeSH).

RESUMEN

Objetivos. Caracterizar filogenéticamente *Ehrlichia canis* a partir de perros naturalmente infectados y sus garrapatas, mediante PCR y secuenciación del gene *16SrRNA* para compararlos con diferentes aislados encontrados en el continente Americano. **Material y métodos.** Se colectaron muestras sanguíneas de 139 perros con manifestaciones clínicas sugestivas a Ehrlichiosis, y que estuvieran infestados con garrapatas; una parte del gene *16SrRNA*, fue secuenciada y alineada junto con las 17 secuencias reportadas en los países de América. Se construyeron dos árboles filogenéticos utilizando el método de Máxima verosimilitud compuesta, y Máxima parsimonia. **Resultados.** Fueron positivos

a *E. canis* 25/139 (18.0%) perros y 29/139 (20.9%) garrapatas colectadas sobre los perros. Las manifestaciones clínicas presentadas fueron fiebre, astenia, depresión y vómito. Las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor variabilis* y *Haemaphysalis leporis-palustris* fueron positivas para *E. canis*. El análisis filogenético mostró que las secuencias 16SrRNA de *Ehrlichia canis* aisladas de perros y garrapatas en este estudio forman un tercer grupo que diverge de las secuencias de Sudamérica y EUA. **Conclusiones.** Es el primer análisis filogenético de *E. canis* en México. Hay diferencias entre las secuencias de este estudio, con las reportadas en otros países de Sudamérica y en EUA. Esta investigación sienta las bases para profundizar en el estudio de la variabilidad genética.

Palabras clave: Ehrlichiosis, secuenciación, 16SrRNA, genética, etiología (Fuente: MeSH).

INTRODUCTION

Ehrlichia canis is an obligate intracellular bacteria, the causative pathogen of Canine monocytic ehrlichiosis (CME), which is a potentially zoonotic vector-borne disease (1,2). The vector is *Rhipicephalus sanguineus* ticks. CME distribution is closely related to the distribution of the vector (3). The national seroprevalence of dogs in Mexico is 33% and 74.5% in the northwest of the country (4). The clinical symptoms commonly seen with this disease in infected dogs are fever, vomiting, arthralgia, rash, and diarrhea (5). Diagnosis is based on visualization of the morula in monocyte and enzymatic-immunoassay (4); however, as molecular tools 16SrRNA gene detection by PCR and sequencing have been successfully used for diagnosis (6,7). In Venezuela, *E. canis* was isolated from blood of an asymptomatic patient, and another study in infected dogs and ticks from the same region suggest that it is a zoonotic pathogen (2,8).

Because of the high seroprevalence of infection on dogs from Mexico, is necessary to determine the actual frequency using molecular methods, and knowing the genetic variability of *E. canis* in dogs and ticks reported from American countries. According to this, the aim of this study was to determine the frequency of *Ehrlichia canis* in dogs naturally infected, as well as infesting ticks it, comparing the sequences identified in Mexico with those published in GenBank from American countries, and perform phylogenetic analysis looking for the relation between isolates.

MATERIAL AND METHODS

Study areas and samples collection. The study was conducted in Northwestern of Mexico, state of Sinaloa. The study was approved by Comisión Nacional de Investigación (R-2013-069, México). Samples were collected from July 2010 to August 2011. In this study, dogs captured by the pound in three cities of North, Central and South, as

INTRODUCCIÓN

Ehrlichia canis es una bacteria intracelular obligada, patógeno causal de la Ehrlichiosis Monocítica Canina (CME), una enfermedad transmitida por garrapatas y potencialmente zoonótica (1,2). Sus vectores son las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y *Dermacentor variabilis*. La distribución de CME está estrechamente relacionada con la distribución del vector (3). En México, la seroprevalencia nacional en perros es de 33%, y 74.5% en el noroeste del país (4). Las manifestaciones clínicas en los perros infectados son: fiebre, vómito, artralgia, rash, y diarrea (5). El diagnóstico se basa en la visualización de la mórula dentro del monocito e inmunoensayo-enzimático (4); sin embargo, las herramientas moleculares como la detección del gene 16SrRNA mediante PCR y secuenciación han sido utilizadas exitosamente para el diagnóstico (6,7). En Venezuela, se aisló *E. canis* en sangre de humano con presentación clínica asintomática; y posteriormente, otro estudio en perros y garrapatas infectadas de la misma región geográfica sugiriendo que es un patógeno de comportamiento zoonótico (2,8).

Debido a la alta seroprevalencia de infección en perros de México, es necesario determinar la frecuencia real mediante técnicas moleculares, conocer la variabilidad genética de *E. canis* en los perros infectados y de las garrapatas reportadas en América. Acorde a esto, el objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de *Ehrlichia canis* en perros naturalmente infectados; así como, la frecuencia de las garrapatas que lo están infestando, comparar las secuencias identificados en México con aquellas publicadas en el GenBank de países Americanos y realizar un análisis filogenético buscando la relación entre los aislados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sitio de estudio y recolección de muestras. El estudio se llevó a cabo en el Noroeste de México, en el estado de Sinaloa. El estudio fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación (R-2013-785-069; México). Las muestras fueron

well as dogs carried to any veterinary of Sinaloa were included. As well as owners of sick dogs, workers of veterinary and kennels to participate in the study, prior informed consent; 88 owners and kennel workers accepted and we collected their blood samples for finding infection (data not shown). 139 dogs with suggestive clinical manifestations were taken blood samples, and two ticks were collected from each dog.

Ticks were identified morphologically by entomologists, using dichotomous keys. DNA from 139 blood samples dogs of and ticks was extracted with QIAamp® DNA Blood kit (Qiagen, CA), and stored at -80 until the processing. For *E. canis* and *Ehrlichia* spp. detection, part of 16SrRNA gene was amplified with ECC-ECB and HE3-ECA primers, previously described (2,8) amplified an expected band 389pb; and sequencing was performed using 15F-842R primers, previously described amplifying the 16SrRNA gene, with an expected band of 800bp (9). In each reaction was included a positive and negative (distilled water) control.

Sequencing. Positive samples to *Ehrlichia canis* were purified by the kit protocol of QIAquick Gel Extration Minikit (Qiagen, CA). Sequences were analyzed with Chromas 233 program, and the search was conducted in GenBank database to determine the species and homology.

Phylogenetic analysis. 15-856 region of the 16SrRNA gene was sequenced and aligned individually with MUSCLE program. The phylogenetic trees were performed with the program MEGA v.5, using the Maximum Likelihood Composite (MLC) method, and Maximum Parsimony method, by assembling data from bootstrap in 1,000 repetitions. The Neighbor-Join algorithm was used to obtain the initial tree, with 10 replicas of the sequences (10,11).

RESULTS

Of 139 dogs, were obtained 41 positive dogs with clinical manifestations (Table 1). *Ehrlichia* spp. was found in 41/139 (27.52%) from dogs with clinical suspect, where *E. canis* was detected in 25/139 (18.0%). The tick *R. sanguineus* was the most prevalent (92.1%), and were identified *Ixodes scapularis*, *H. leporis-palustris* and *D. variabilis* ticks. Were positive to *Ehrlichia* spp. 32/139 (23.2%) ticks and 29/139 (20.86) ticks to *E. canis* (Table 2). The dogs risk to be infected with *E. canis* when ticks were positive was 8.24 OR (IC 3.2-21.9, 95%).

colectadas de Julio del 2010 hasta Agosto del 2011. Se incluyeron en el estudio los perros capturados por las perreras municipales de tres ciudades al Norte, Centro y Sur del estado, así como los perros llevados a revisión a alguna de las clínicas veterinarias de participantes. Se invitó a los dueños de los perros enfermos, trabajadores de las clínicas veterinarias y de las perreras a participar en el estudio, previo consentimiento informado; 88 personas aceptaron y se les tomó muestra sanguínea para la búsqueda de infección (resultados no mostrados). Se les tomó muestra sanguínea a 139 perros con manifestaciones clínicas sugestivas, y que estuvieran infestados con garrapatas. Se colectaron dos garrapatas por cada perro. Las garrapatas fueron identificadas morfológicamente por entomólogos, mediante claves dicotómicas.

El ADN de las muestras sanguíneas de los 139 perros y las garrapatas fue extraído con el kit QIAamp® DNA Blood purificación (Qiagen, CA), y se congeló el ADN a -80°C, hasta su procesamiento. Para la detección de *E. canis* y *Ehrlichia* spp., se amplificó una parte del gene 16SrRNA, utilizando los iniciadores ECC-ECB y HE3-ECA descrito previamente (2,8) amplificando una banda esperada de 389pb; la secuenciación se realizó con los iniciadores 15F-842R, previamente descritos amplificando el gene 16SrRNA, con una banda esperada de 400pb (9). En cada reacción se incluyó un control positivo y negativo (agua destilada).

Secuenciación. Las muestras positivas a *Ehrlichia canis* fueron purificadas mediante el kit comercial de QIAquick Gel Extration Minikit. Las secuencias fueron analizadas con el programa Chromas 233, y se realizó la búsqueda en base de datos de GenBank, para determinar la especie y homología.

Análisis filogenético. Fue secuenciada una parte ubicada entre la región 15-856 del gene 16SrRNA, y alineada de manera individual con el programa MUSCLE. Los árboles filogenético se realizaron mediante el programa MEGA v.5, utilizando el método de Máxima Verosimilitud Compuesta (MLC), y Máxima Parsimonia, mediante el ensamblaje de 1,000 datos en repeticiones aleatorizadas. El algoritmo del vecino más cercano fue utilizado para obtener el árbol inicial, con 10 réplicas de las secuencias (10,11).

RESULTADOS

De los 139 perros muestreados, se obtuvieron 41 perros con síntomas clínicos (Tabla 1). Para *Ehrlichia* spp., se encontró 41/139(27.52%) de los perros positivos, de los cuales *E. canis* fue detectada en 25/139 (18.0%). La garrapata *R. sanguineus* fue la prevalente (92.1%),

Table 1. Clinical manifestations presented in dogs positive for *Ehrlichia* infection.

Clinical manifestation	Dogs with Ehrlichiosis (%)	P value	OR 95% CI
Fever	19 (61.0)	<0.01	8.04 (2.84-23.02)
Asthenia	23 (74.2)	≤0.01	12.27 (4.18-37.28)
Depression	6 (25.0)	<0.01	5.86 (1.95-16.86)
Vomiting	13 (42.0)	<0.01	4.46 (1.55-13.00)
Nausea	13 (42.0)	<0.01	3.82 (1.40-10.56)
Petechiae	9 (19.4)	<0.01	15 (2.05-140.00) *
Anorexia	12 (38.7)	NS	-
Epistaxis	1 (3.2)	NS	- *
Mane	2 (6.4)	NS	- *

* Fisher test. NS: Not significative.

Table 2. Identification, developmental stage and results of ticks collected.

Identification	No. ticks (%)	Stadiums			Results	
		♂	♀	Nymphs	<i>Ehrlichia</i> spp (%)	<i>E. canis</i> (%)
<i>R. sanguineus</i>	128 (92.1)	44	58	26	28 (87.5)	27 (93.1)
<i>D. variabilis</i>	6 (4.3)	0	6	0	2 (6.20)	1 (3.45)
<i>H. leporispalustris</i>	3 (2.1)	0	2	1	1 (3.15)	0
<i>I. scapularis</i>	1 (0.72)	0	1	0	0	0
<i>Boophilus</i> spp	1 (0.72)	1	0	0	0	0
Total	139	45	67	27	32	29

♂: Male adult tick. ♀: Female adult tick.

We sequenced six positive products for *E. canis*; three dog samples and three tick samples. The *16SrRNA* gene amplified from dogs and ticks (GenBank No. KP844657-62) showed a 99.8% homology with *Ehrlichia canis* strain Jake, *E. canis* HEV, *E. canis* VDE and *E. canis* strain Brazil- COI sequences (Table 3).

Table 3. Frequency of substitution (%) among isolates of *Ehrlichia canis* in dogs and ticks isolates found in the Americas.

Sequences	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
E. canis str. Jake	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. canis str. Brazil-CO2	0.0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. canis str. Brazil-CO1	0.0000	0.0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. canis M7322680	0.0025	0.0025	0.0025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. canis str. Oklahoma	0.0025	0.0025	0.0025	0.0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. canis iso. VDE	0.0000	0.0000	0.0000	0.0025	0.0025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. canis iso. VHE	0.0000	0.0000	0.0000	0.0025	0.0025	0.0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. canis DQ91597080	0.0000	0.0000	0.0000	0.0025	0.0025	0.0000	0.0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. canis iso. Belem_Ec01	0.0025	0.0025	0.0025	0.0050	0.0050	0.0025	0.0025	0.0025	-	-	-	-	-	-	-	-
E. canis U2674080	0.0000	0.0000	0.0000	0.0025	0.0025	0.0000	0.0000	0.0000	0.0025	-	-	-	-	-	-	-
E. canis AY39446580	0.0025	0.0025	0.0025	0.0050	0.0050	0.0025	0.0025	0.0025	0.0050	0.0025	-	-	-	-	-	-
Sinaloa Tick6g	0.0476	0.0476	0.0476	0.0503	0.0503	0.0476	0.0476	0.0476	0.0503	0.0476	0.0504	-	-	-	-	-
Sinaloa Tick32g	0.0476	0.0476	0.0476	0.0503	0.0503	0.0476	0.0476	0.0476	0.0503	0.0476	0.0504	0.0050	-	-	-	-
Sinaloa Tick18g	0.0476	0.0476	0.0476	0.0503	0.0503	0.0476	0.0476	0.0476	0.0503	0.0476	0.0504	0.0050	0.0050	-	-	-
Sinaloa Dog31p	0.0447	0.0447	0.0447	0.0474	0.0474	0.0447	0.0447	0.0447	0.0474	0.0447	0.0475	0.0616	0.0616	0.0616	-	-
Sinaloa Dog56p	0.0476	0.0476	0.0476	0.0503	0.0503	0.0476	0.0476	0.0476	0.0503	0.0476	0.0504	0.0706	0.0706	0.0706	0.0364	-
Sinaloa Dog75p	0.1089	0.1089	0.1089	0.1118	0.1118	0.1089	0.1089	0.1089	0.1118	0.1089	0.1121	0.1382	0.1350	0.1382	0.0985	0.0961

* Analyses were performed using Maximum Likelihood Composite method.

además, se identificaron las garrapatas *Ixodes scapularis*, *H. leporis-palustris* y *D. variabilis*. Fueron positivas para *Ehrlichia* spp., 32/139(23.2%) garrapatas y 29/139(20.86) a *E. canis* (Tabla 2). El riesgo de los perros de contraer la infección con *E. canis* cuando las garrapatas son positivas es de 8.24 OR (CI 3.2-21.9, 95%).

De los productos positivos, se secuenciaron 6 muestras para *E. canis*; tres muestras de perros de tres diferentes regiones geográficas y tres muestras de diferentes especies de garrapatas. Las secuencias amplificadas del gene *16SrRNA* de perros y garrapatas mostraron una homología de 99.8% (GenBank No. KP844657-62) a la secuencia de *Ehrlichia canis* cepa Jake, *E. canis* VHE, *E. canis* VDE, y *E. canis* cepa Brazil-COI (Tabla 3).

Se realizaron dos árboles: el primero con el método de Máxima verosimilitud (Figura 1), en cual muestra el árbol con la probabilidad de registro más alto (-1074.2304); se construyó de forma automática, con la búsqueda heurística mediante la aplicación del algoritmo de vecino más cercano con una matriz de distancias estimadas por pares, utilizando el método de MCL; después de seleccionar la topología con un valor de probabilidad log superior. El árbol se muestra a escala, con longitudes de rama medidos en el número de sustituciones por sitio.

Two trees were performed: the first with Maximum likelihood method (Figure 1), in which shows the tree with the highest log likelihood (-1074.2304); was constructed automatically, with the heuristic search by applying Neighbor-Join algorithm with a matrix of pairwise distances estimated, using MCL method; after selecting the topology with a value greater likelihood log. The tree was drawn to scale with branch lengths calculated using the average pathway method and are in the units of the number of changes over the whole sequence.

The second tree was constructed by Maximum Parsimony method (Figure 2). Tree number 1 out of 10 most parsimonious trees (length = 91) is showed. The consistency index is 0.967033 (0.936170), the retention index is 0.972973 (0.972973), and the composite index is 0.940897 (0.910868) for all sites and parsimony-informative sites. The Maximum parsimony tree was obtained using the Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) algorithm with search level 0 in which the initial trees were obtained by the random addition of sequences (10 replicates).

El segundo árbol se construyó mediante el método de Máxima Parsimonia (Figura 2). Se muestra el mejor árbol de los 10 árboles más parsimoniosos (longitud=91). El índice de consistencia es 0.967033 (0.936170), el índice de retención fue de 0.972973 (0.972973) y el índice compuesto es 0.940897 (0.910868), para todos los sitios y sitios de parsimonia. El árbol se obtuvo utilizando el algoritmo subárbol-poda-reinjerto (SPR) con nivel de búsqueda 0 en el que los árboles iniciales se obtuvieron mediante la adición aleatoria de secuencias (10 repeticiones).

DISCUSIÓN

Estos resultados confirman la existencia del ciclo enzoótico de transmisión a *E. canis* en Sinaloa, México. El 92.1% de las garrapatas identificadas fueron *R. sanguineus*, de las cuales 28 fueron positivas a *Ehrlichia* spp., y 27 positivas a *E. canis*. Dos garrapatas *D. variabilis* adultas fueron infectadas con *Ehrlichia* spp., siendo el primer reporte de esta asociación en México, aunque ya está demostrado de manera

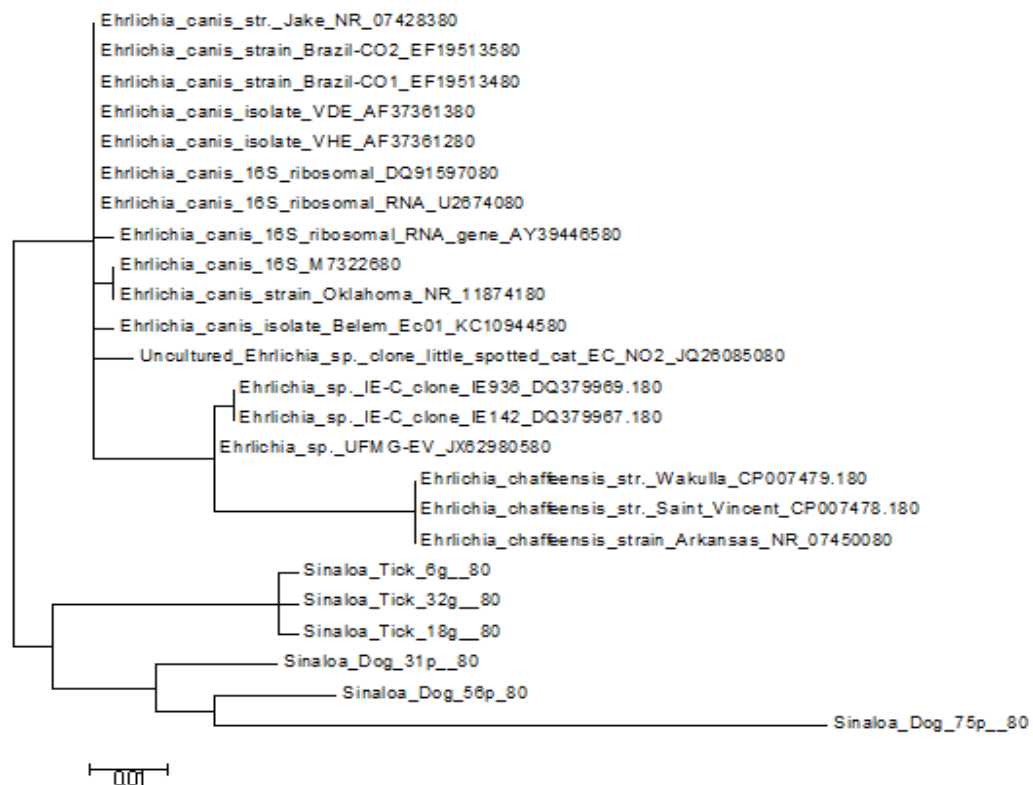


Figure 1. Phylogenetic analysis of 16SrRNA gene of *Ehrlichia canis*, constructed with sequences of America countries by Maximum Likelihood method.

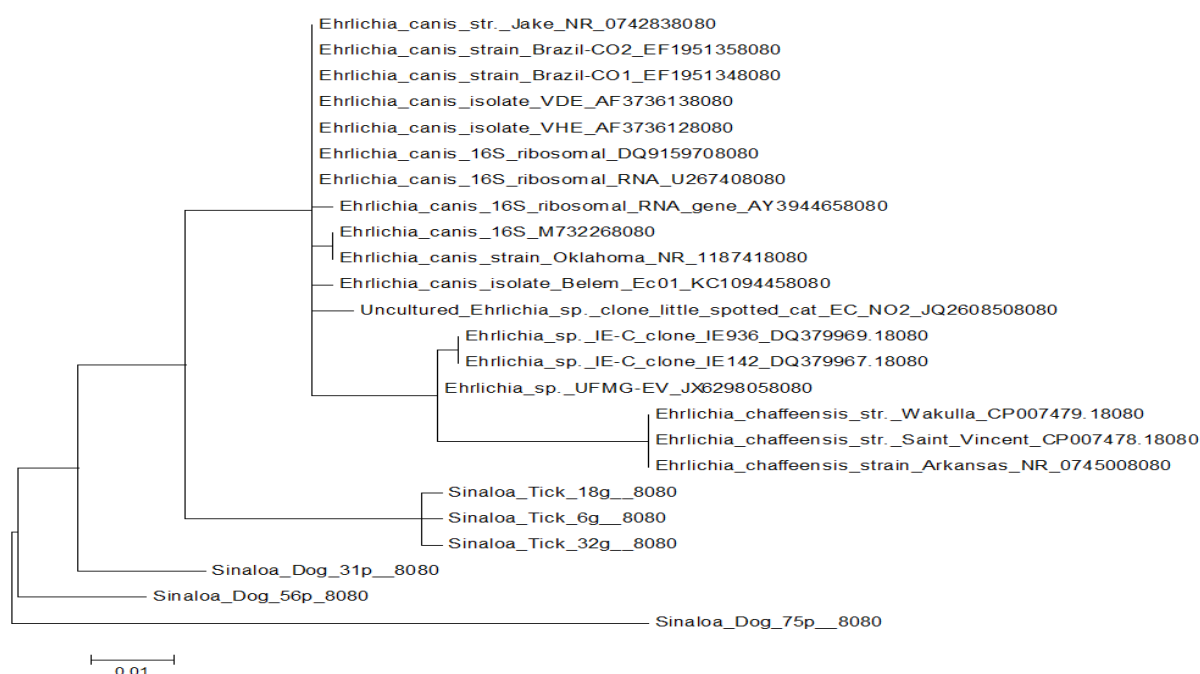


Figure 2. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis*, constructed with sequences of America countries by Maximum Parsimony method.

DISCUSSION

These results confirm the existence of enzootic cycle transmission to *E. canis* in Sinaloa, Mexico. 92.1% of the ticks identified were *R. sanguineus*, in which 28 were positive for *Ehrlichia* spp., and 27 positive to *E. canis*. Two adult *D. variabilis* ticks were infected with *Ehrlichia* spp. This is the first report of this association in Mexico. It was already experimentally demonstrated the competitiveness of this vector to transmit the bacteria (4). Antibodies to *E. canis* can remain elevated during a period of time prolonging, causing false positives in endemic areas.

It is the first evidence of *E. canis* in *H. leporis-palustris* ticks in Mexico. It may represent the presence of potential vectors, capable of transmitting *E. canis*. More information is needed in order to prove if this vector can take on the role of competent vectors; ie, capable of transmitting the pathogen and causing the disease.

The presence of three main groups (I, II and III) for *E. canis*, shows that this pathogen has few variables in America, similar to that found in other studies (6). Although, Mexican isolates show differences between the groups I and II; the sequences found, presented an ancestral relationship with the sequences from Venezuela, Brazil and the United States; hypothesizing that it is possible to find the same variant of *E. canis* among American countries. It is required more phylogenetic analysis of *E. canis*

experimental la competitividad de este vector para transmitir la bacteria (4). Los anticuerpos a *E. canis* pueden permanecer elevados durante un período de tiempo prolongando, provocando falsos positivos en zonas endémicas.

Es la primera evidencia de *E. canis* en las garrapatas *H. leporis-palustris* en México. Lo que pudiera representar la presencia de vectores potenciales, capaces de transmitir *E. canis*. Se necesita más información al respecto, para conocer si estos vectores pueden adquirir el papel de vectores competentes; es decir, capaces de transmitir este patógeno y causar la enfermedad.

La presencia de tres grupos principales (I, II y III) para *E. canis*, demuestra que este patógeno presenta pocas variables en el continente Americano, similar a lo encontrado en otro trabajo (6). Aunque los aislados mexicanos muestran diferencias entre los grupo I y II, las secuencias encontradas presentaron una relación ancestral con las secuencias de Venezuela, Brasil y Estados Unidos; hipotetizando que es posible encontrar la misma variante de *E. canis* entre los países de América. Es necesario realizar el análisis filogenético de *E. canis* entre las secuencias presentes a nivel mundial, así como, la búsqueda de otros genes con mayor variabilidad y observar el comportamiento.

between worldwide sequences, and search for other genes with greater variability and observe the behavior.

This study presents the first molecular evidence of *E. canis* in dogs and ticks from Sinaloa, Mexico. The results show a high risk of infection in tick-infested dogs. In Mexico, recent study in ticks proves a high frequency of infection of *E. canis*, and could play a high risk in humans and dogs (12). The importance of understanding the enzootic cycle of *Ehrlichia* in ticks, wild and domestic reservoirs, can help implement strategies to prevent infection in dogs (12, 13).

This research provides the assessment for further study of genetic variability in isolated not only from *E. canis*, but the rest of vector, helping to understand the behavior and potential targets in preventing diseases.

Acknowledgments

The authors wish to thank Abha Grover for grammar and language revision of this article. This work was supported by CONACYT-Health 2008-1 87,868 and a school scholarship from CONACYT: 252266.

Este estudio presenta las primeras evidencias moleculares de *E. canis* en perros y garrapatas de Sinaloa, México. Los resultados muestran un alto riesgo de infección en perros infestados con garrapatas (12). La importancia de entender el ciclo enzoótico de *Ehrlichia* en garrapatas, reservorios silvestres y domésticos, puede ayudar a realizar estrategias para prevenir la infección en los perros (12,13).

Esta investigación sienta las primeras bases para profundizar en el estudio de la variabilidad genética, en aislados no sólo de *E. canis*, sino del resto de las enfermedades transmitidas por vector, ayudando a entender el comportamiento, y posibles blancos en su prevención.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a Abha Grover por las correcciones gramaticales y de lenguaje en este artículo. El proyecto fue financiado por: CONACYT-Salud 2008-1 87868 y una beca escolar otorgada por CONACYT: 252266.

REFERENCES

1. Sainz A, Rouna X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, Solano-Gallego L. Guideline for veterinary practitioners on canine Ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors* 2015; 8:75. doi: 10.1186/s13071-015-0649-0
2. Perez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Rikihisa, Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1078:110-117.
3. Villaescusa A, Tesourob MA, García-Sanchoa M, Ayllona T, Rodriguez-Franco F, Sainz A. Evaluation of peripheral blood lymphocyte subsets in family-owned dogs naturally infected by *Ehrlichia canis*. *Comparative Immunology. Microbiol Infect Dis* 2012; 35:391-396.
4. Sosa-Gutierrez CG, Quintero MT, Gaxiola CS, Cota GS, Esteve-Gassent MD, Gordillo-Perez MG. Frequency and clinical epidemiology of Canine Monocytic Ehrlichiosis in Dogs infested with ticks from Sinaloa, Mexico. *J Vet Med* 2013; 797019.
5. Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:719-756.
6. Siarkou VI, Mylonakis ME, Bourtzi-Hatzopoulou E, Koutinas AF. Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. *Vet Microbiol* 2007; 125(3-4):304-312.
7. Carvalho FS, Wenceslau AA, Carlos RSA, Albuquerque GR. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. *Genet Mol Res* 2008; 7(3):657-662.
8. Dumler JS. Ehrlichiosis y anaplasmosis en las Américas. *Acta méd costarric* 2013; 55(1):1-5.
9. Vinasco J, Li O, Alvarado A, Diaz D, Hoyos L, Tabachi L, Sirigireddy K, Ferguson C, Moro MH. Molecular evidence of new strains of *Ehrlichia canis* from South America. *J Clin Microbiol* 2007; 45(8):2716-2719.

10. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molec Biol Evol* 1993; 10:512-526.
11. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Moler Biol Evol* 2011; 28:2731-2739.
12. Sosa-Gutierrez CG, Vargas-Sandoval M, Torres J, Gordillo-Perez MG. Tick-borne rickettsial pathogens in questing ticks, removing from humans and animals in Mexico. *J Vet Sci* 2015; 17(3):353-360.
13. Walker DH, Paddock CD, Dumler JS. Emerging and Re-emerging Tick-Transmitted Rickettsial and Ehrlichial Infections. *Med Clin N Am* 2008; 92:1345-1361.